Medical Library

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
INSTITUT D'HYGIÈNE EXPÉRIMENTALE ET DE PARASITOLOGIE
DIRECTEUR : PROF. Dr BRUNO GALLI-VALERIO

LA COLORATION DU GONOCOQUE

par la Méthode de Thim

comparée à quelques autres procédés

DISSERTATION

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Vésséline-T. TCHOUÏTCH
(de Serbie)

LAUSANNE
IMPRIMERIE COMMERCIALE
Avenue de l'Université, 5

1923

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
INSTITUT D'HYGIÈNE EXPÉRIMENTALE ET DE PARASITOLOGIE
DIRECTEUR : PROF. Dr BRUNO GALLI-VALERIO

LA COLORATION DU GONOCOQUE

par la Méthode de Thim

comparée à quelques autres procédés

DISSERTATION

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Vésséline-T. TCHOUÏTCH
(de Serbie)

LAUSANNE
IMPRIMERIE COMMERCIALE
Avenue de l'Université, 5

1923

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DE MÉDECINE

La Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne, sans se prononcer sur les opinions du candidat et ensuite des rapports favorables de MM. les professeurs Galli-Valerio et Dind, autorise l'impression de la thèse intitulée

La Coloration du gonocoque par la méthode de Thim comparée à quelques autres procédés

présentée par M. **Vésséline-T. Tchouïtch** *pour l'obtention du grade de* **Docteur en médecine.**

Lausanne, le 7 juillet 1923.

Le Doyen :
Maurice ARTHUS, prof.

Je considère comme un devoir d'exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le professeur Dr Bruno Galli-Valerio pour ses précieux conseils durant l'élaboration de ma thèse.

V.-T. T.

A mon cher père.

I. INTRODUCTION

Une question très importante qui intéresse vivement les bactériologues comme tous les médecins praticiens, est la coloration du gonocoque dans les cas aigus ou chroniques. Toutes les recherches en vue d'une coloration spécifique du gonocoque sont restées infructueuses. Les colorations que nous possédons aujourd'hui n'ont qu'une valeur relative. La méthode de Gram est la seule qui soit réellement différentielle. Mlle Tchernobilsky, étudiant[1] toutes les colorations pour le gonocoque, a établi *qu'aucune des colorations examinées n'est spécifique.* Frank[2] reprend cette question avec le nouveau procédé de Kindborg et il arrive aux mêmes conclusions. Chaque mode de coloration comporte un élément de supériorité sur ses voisins, mais tous ont leurs imperfections.

Je me suis proposé une fois de plus, sur le conseil du professeur Bruno Galli-Valerio, de contribuer par de nouvelles observations à enrichir pratiquement les méthodes de coloration du gonocoque. Ces travaux d'investigations présentent une haute importance, tant au point de vue médical que social. La blennorragie règne partout, surtout dans les pays où la guerre a sévi. Aujourd'hui, c'est une question primordiale de découvrir et de traiter le plus vite possible les blennorragiques. C'est pour ces raisons que la coloration du gonocoque est d'une grande importance, parce qu'on doit tâcher de donner aux médecins praticiens des méthodes bonnes et faciles, permettant si possible un diagnostic plus précis.

Un autre point de vue, tant médical que social, dans la recherche du gonocoque, est l'examen des prostituées. Bien que ces recherches ne soient pas fructueuses parce que les prosti-

[1] Recherches comparatives sur les différentes méthodes de coloration du gonocoque. — Thèse, Lausanne 1914.

[2] La coloration différentielle du gonocoque par le procédé de Kindborg. — Thèse, Lausanne 1919.

tuées d'aujourd'hui savent bien se préparer aux consultations et contrebalancer ainsi les efforts des médecins; toutefois tous les médecins réclament des procédés plus pratiques pour découvrir chez elles rapidement le gonocoque. C'est ce qui a produit une grande émulation chez les bactériologues, pour essayer d'obtenir une coloration pratique et spécifique.

Le gonocoque découvert par Neisser en 1879 est rarement libre, mais est ordinairement inclus dans les globules du pus. Très souvent, au microscope, on peut voir de nombreux diplocoques placés sur les cellules épithéliales. De nombreux auteurs français les prennent souvent pour des gonocoques; mais dans la majorité des cas ils n'ont rien à faire avec eux.

Il est très important d'avoir des procédés de recherches sûrs, mais simples. Les colorations doivent être d'une exécution rapide et d'une technique à la portée de tout praticien. Il est évident que toutes les colorations du gonocoque doivent toujours s'associer avec la méthode de Gram, laquelle constitue le contrôle le plus sûr, car les gonocoques sont toujours Gram négatifs. Spécialement dans les examens médico-légaux, ce contrôle doit être exigé, si l'on veut éviter des erreurs qui peuvent avoir de graves conséquences.

Toutes ces questions ayant une grande importance, j'ai pris avec un vif intérêt la résolution d'examiner un nouveau procédé proposé par Thim, en le comparant avec d'autres procédés de coloration du pus à gonocoques.

II. TECHNIQUE DE LA PRÉPARATION ET COLORATION DES FROTTIS

Préparer tout le nécessaire pour l'examen du gonocoque est une affaire très délicate. Souvent il arrive que notre examen échoue à cause d'une mauvaise technique et d'une préparation inhabile. Si l'on veut un bon succès dans la recherche du gonocoque, il faut travailler soigneusement et avoir au moment donné tout à sa disposition.

Le pus de la sécrétion blennorragique doit s'étendre avec un fil de platine, passé préalablement à la flamme et refroidi. Le pus doit être étalé doucement sans comprimer, afin de ne pas écraser les éléments sur le porte-objet. Les couches seront aussi minces que possible, sauf dans des cas particuliers, où l'on pourra utiliser la goutte épaisse. De même, il faut éviter d'étendre le pus avec un autre porte-objet ou lamelle, parce qu'on gâte les frottis qui deviennent moins clairs et très difficiles à colorer. Il ne faut pas étendre le pus non plus avec de la ouate fixée sur une allumette ou sur un autre objet, parce qu'on écrase les leucocytes et on ne voit pas bien la disposition typique des gonocoques intra-cellulaires.

Les porte-objets à employer de préférence aux couvre-objets doivent être bien lavés et essuyés avant de faire les frottis. Souvent les verres sont graisseux et les couleurs ne prennent pas ou très mal et nous avons beaucoup plus de peine pour l'examen. Avant de déposer le pus, il faut avoir soin de passer le porte-objet dans la flamme afin de bien le dégraisser. Une fois le frottis fait, il faut le fixer immédiatement en le passant un peu sur la flamme, sans trop le chauffer.

C'est souvent par négligence dans la fixation et par une mauvaise exécution de la coloration que les frottis ne donnent pas les résultats voulus. On doit contrôler les couleurs d'aniline, parce qu'elles peuvent s'altérer à la lumière et à la chaleur, et il faut les conserver à l'abri de la lumière dans des flacons bruns. Si un colorant se précipite ou se trouble, il faut l'écarter.

On colore les frottis avec différentes couleurs et on compare les résultats, ce qui montre l'efficacité et l'avantage de certains colorants dans certains cas. Toutefois il est bon pour un même colorant et pour un même cas, de colorer différemment certains frottis et de comparer les résultats obtenus; ainsi nous pouvons colorer des frottis différents en tenant compte du temps nécessaire de coloration, des parties minces ou en goutte épaisse, des cas aigus ou chroniques, soit chez l'homme, soit chez la femme, etc.

Nous avons deux groupes de colorations : les colorations

simples et les colorations doubles; les premières colorent tout en une couleur avec des nuances d'intensité, les deuxièmes colorent les éléments, les gonocoques et autres microorganismes d'une façon différente. La coloration double est une coloration très avantageuse pour la recherche du gonocoque, car elle donne beaucoup de contraste; seulement elle est quelquefois d'une technique plus compliquée.

Il est indispensable de pouvoir disposer de deux préparations pour la coloration des gonocoques, car il faut toujours faire un contrôle au Gram. En cas contraire, il faut placer le pus du même malade aux deux bouts d'un porte-objet et couper le porte-objet en deux : une moitié pour la coloration ordinaire et l'autre pour le Gram. Cette méthode est excellente pour l'examen et le contrôle; de cette façon, on pourra éviter le mélange des frottis dans les ambulances et les hôpitaux pendant l'examen des nombreux malades.

Je dois remercier vivement MM. les Docteurs Simonin, Isenegger, Cornaz, Gonin, Frank et Guisan, qui m'ont procuré le matériel nécessaire pour mes recherches.

III. LA COLORATION PAR LE PROCÉDÉ DE THIM

La nouvelle méthode de coloration du gonocoque du docteur Thim [1] a été trouvée en 1919. Partant de l'idée que nous ne possédons jusqu'à présent aucune coloration spécifique du gonocoque, Thim a préparé un double colorant composé de gentiane phéniquée et de bleu de méthylène de Löffler dans la proportion de 1 : 2. Du bleu de méthylène est né, par oxydation chromatique, un nouveau colorant, probablement l'azur de méthylène. Ce colorant de Thim peut être obtenu déjà préparé chez Grübler, à Leipzig, et j'ai employé pour mes recherches une de ces solutions.

[1] *Wiener med. Wochenschrift,* N° 51 pour 1919, page 472.
Dermatologische Wochenschrift, 1920, Band 70, page 74.
Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Berlin 1921, Band 92, page 115.

a) Technique.

La technique conseillée par Thim pour la coloration du gonocoque est la suivante :

1. *Frottis sur porte-objet.* — Avec un fil de platine stérilisé on enlève la sécrétion du pus de l'urèthre que l'on dépose sur un porte-objet ou entre deux lamelles (qui se séparent avec deux pincettes de Cornet) et que l'on agite pour obtenir un séchage rapide. Ce séchage peut s'accélérer par un léger chauffage sur la flamme.

2. *Coloration.* — Pour la coloration, on prend les verres avec une pince de Cornet, puis on verse sur le verre la solution colorante avec un compte-goutte (sans toucher le porte-objet ou la lamelle), jusqu'à ce qu'elle couvre entièrement le frottis. On laisse le colorant agir 5-10-15 secondes au maximum à froid.

3. *Lavage.* — Après la coloration, enlever la solution de couleur avec de l'eau et ensuite on sèche avec le papier buvard et la flamme. Ainsi obtenue, la préparation sera examinée au microscope à l'immersion.

Cette technique compliquée peut être simplifiée d'après les indications que j'ai données. Le papier buvard pour le séchage de la préparation n'est pas à conseiller; je suis de l'avis de Frank[1] sur ce point et, me basant sur mes expériences, j'ai constaté que le buvard est souvent capable de détériorer les frottis et de gâter la préparation. Il est évident qu'une attention soigneuse peut éviter les mauvaises conséquences du buvard, mais comme la technique doit autant que possible être simplifiée pour le praticien qui manque du matériel d'un médecin d'hôpital, le séchage à la flamme est à conseiller.

Colorant par le procédé de Thim[2], nous devons obtenir un aspect microscopique tel que celui-ci :

a) Dans le pus, il y a de nombreux leucocytes, rares nu-

[1] Thèse citée, page 10.
[2] *Zeitschrift für Hygiene,* etc., ouvrage déjà cité.

cléoles agrandis, ronds, bleu foncé avec une auréole rose-violet.

b) Dans les cellules épithéliales, on voit de nombreux « yeux d'oiseaux *(Vogelaugen)* de Thim » en forme de nucléoles entourés d'une auréole rougeâtre, parsemée de points noirs dans les bords. Ces points noirs sont pour Thim des spores ou des coques.

c) Les gonocoques sont colorés en bleu foncé, presque noir.

Ma technique simplifiée est la suivante : on verse sur le frottis, puis on laisse agir 5-10 secondes la solution de Thim; on lave immédiatement sous le robinet à l'eau courante, on sèche sur la flamme et on examine à l'immersion. En employant cette technique simplifiée, j'ai toujours très bien réussi.

b) Observations personnelles

La méthode de coloration de Thim est un très bon procédé pour la recherche du gonocoque. Faisant moi-même des expériences avec de nombreuses préparations, j'ai obtenu des résultats très satisfaisants. Une chose que j'ai remarquée est que cette substance colorante se conserve très longtemps, non seulement des semaines, comme dit Thim, mais des mois. Lorsque j'ai examiné les frottis colorés par le Thim, j'ai eu de très bons résultats et pourtant, à ce moment, la solution était âgée de neuf mois; trois mois plus tard, j'ai obtenu les mêmes résultats, seulement la solution était un peu atténuée. Une année plus tard, le Thim devient tout à fait bleu, sans trace de violet ou d'autre couleur caractéristique. La couleur est bleue, plutôt bleu d'azur, mais les gonocoques sont toujours d'une couleur bleu foncé, presque noir. Il est bien évident que cette solution doit être conservée à l'abri de la lumière et de la chaleur et il faut avoir soin de ne pas l'agiter, pour éviter des précipités.

J'ai coloré des frottis 10-15 secondes (10 secondes suffisent); j'ai aussi laissé agir la couleur 30-60 secondes; les préparations colorées à 10 secondes donnent un très bon contraste : leucocytes, cellules épithéliales et gonocoques sont bien distincts. Avec les colorations de 30 à 60 secondes, j'ai

obtenu un résultat satisfaisant, seulement les cellules épithéliales, colorées en violet trop foncé, empêchent de distinguer le protoplasma et le noyau. Dans chacun des cas de coloration, j'ai pu remarquer que la coloration de 10 secondes est préférable. Si l'on désire avoir un contraste des éléments pour reconnaître les gonocoques, on peut se servir de la coloration même de 1 à 2 minutes au maximum. Dans tous ces procédés, j'ai toujours vu les gonocoques se détacher en bleu foncé presque noir sur fond rose-violet.

J'ai fait nombre d'expériences en colorant le pus blennorragique chez l'homme et chez la femme, dans des cas aigus et chroniques, avec des frottis minces ou épais. J'exposerai brièvement les observations que j'ai faites dans chacun de ces cas afin d'avoir sur le Thim une idée plus complète.

1. Le procédé de Thim dans la blennorragie aiguë chez l'homme.

La coloration de Thim est très avantageuse pour la blennorragie aiguë. Le médecin trouve, avec cette coloration, un fond très agréable à l'œil où l'on reconnaît facilement les gonocoques, surtout dans les leucocytes. Le contraste est spécialement très bon, et on a le tableau suivant :

Thim 10 secondes. — Nombreux leucocytes polynucléaires bien distincts et colorés avec protoplasme rose pâle et avec noyaux plus foncés, les cellules épithéliales sont rares avec protoplasme coloré en violet clair et noyaux plus foncés. Les gonocoques, dans les leucocytes, sont bien visibles; ceux extra-cellulaires sont plus rares et sont colorés en bleu foncé, presque noir. Sur les cellules épithéliales, on voit de nombreux microorganismes.

Je peux donc affirmer que la coloration de Thim, employée en de nombreux cas pour les gonocoques chez l'homme, a un grand avantage. La technique est facile et très rapide. A côté de cela, le médecin peut, sans beaucoup de peine, reconnaître tous les éléments dans le pus, spécialement les gonocoques, qui se dessinent plastiquement sur un fond rose clair. Par ces résultats, la coloration de Thim occupera une place importante

pour la recherche du gonocoque, non seulement dans les consultations privées, mais surtout chez les prostituées, les militaires, etc.

En outre, j'ai constaté, lors de mes expériences avec le procédé de Thim, un phénomène intéressant qui est le suivant : avec les frottis sans gonocoques, la coloration de Thim paraissait affaiblie, tandis que les frottis avec gonocoques étaient merveilleusement colorés. J'ai renouvelé plusieurs fois mes expériences dans des cas de blennorragie aiguë ou chronique, avec ou sans gonocoques, et j'ai toujours obtenu le même résultat, dû au contraste vif qui se manifeste dans le pus à gonocoques.

La méthode de Thim permet de distinguer les nucléoles des cellules épithéliales. Ces nucléoles, colorés en bleu foncé, sont entourés d'une auréole rose-violet et, par-ci par-là, on voit une nuance bleuâtre, d'où leur apparence « d'yeux d'oiseaux » ou « *Vogelaugen* de Thim »[1]. Dans les cas de blennorragie aiguë, les nucléoles sont, en outre, agrandis et augmentés en nombre ; mais, à part cela, « j'ai trouvé, dit Thim, le plus souvent avec peine, un ou plusieurs points qui rappellent des spores (coques?) n'ayant aucune analogie avec des gonocoques parce qu'ils se colorent différemment. »

Thim insiste sur le fait que la variabilité de grandeur des nucléoles provient sûrement de l'élaboration de toxines diverses. *Si on trouve dans le pus sécrété un épithélium et des nucléoles libres, on doit en conclure que les couches les plus profondes sont atteintes.* Cette interprétation manque d'une base certaine.

Malgré cela, j'ai tenu à examiner le plus attentivement que possible les nucléoles de Thim ou *Vogelaugen*. Après un examen de plus d'une centaine de frottis colorés par la méthode, j'ai trouvé seulement deux ou trois préparations où j'ai pu distinguer cet aspect particulier. Le nucléole observé avait une partie centrale en bleu et un protoplasma clair ; il était entouré d'une auréole rose-rouge pâle. Les petits points noirs, appelés « spores » ou « coques » par Thim, n'ont pas été vus ; un seul

[1] *Zeitschrift für Hygiene*, etc., ouvrage déjà cité.

nucléole présentait au bord de son auréole une toute petite ligne, légèrement épaissie de coloration rouge-violet foncée; je n'ai absolument pas distingué ces points noirs. Je dois ajouter que chaque frottis où j'ai trouvé un nucléole n'en possédait qu'un, mais par contre de nombreuses cellules épithéliales. On ne pourra pas me reprocher de n'avoir pas prélevé mes frottis dans des cas de blennorragie aiguë avec inflammation accentuée, car tous les malades examinés avaient une blennorragie au stade aigu; *aussi dans de nombreuses préparations (20 et plus) d'un même malade, j'ai trouvé un seul nucléole* du type décrit par Thim! Tout cela fortifie notre scepticisme à l'égard de la théorie de Thim.

Je me rattache à l'idée du professeur Galli-Valerio : il est possible que ces nucléoles soient, en réalité, des granulations protoplasmiques qui dérivent de la désintégration des épithéliums.

J'ai aussi appliqué la méthode de Thim à des frottis en goutte épaisse. Les préparations, ainsi colorées, sont sur les bords assez claires et transparentes, avec un contraste satisfaisant. Par ces expériences, j'ai l'impression : que la coloration de Thim est surtout importante pour faire ressortir tous les éléments de la préparation, mais surtout les gonocoques même masqués et cachés dans l'épaisseur du pus. Bien entendu, il faut toujours examiner et fouiller les bords de ces préparations épaisses et éviter le centre. Si on décolore les frottis colorés par la méthode de Thim, avec l'alcool à 96° pendant 30-60 secondes, la coloration de Thim perd tous ces caractères; la coloration rose disparaît pour être remplacée par une teinte bleuâtre, les éléments sont mal colorés, on a enfin l'impression que la coloration de Thim est dissoute ou disparue. Pour ces raisons, il faut éviter de décolorer les préparations en goutte épaisse colorées par le Thim avec l'alcool.

2. Procédé de Thim dans la blennorragie aiguë chez la femme.

La méthode de Thim colore aussi très bien les éléments et les gonocoques de la blennorragie de la femme comme chez

l'homme. D'autres microorganismes associés chez la femme possèdent la même coloration que le gonocoque, d'où la grande difficulté de la différenciation. Mais pour que la coloration de Thim prenne bien, il faut recueillir soigneusement les sécrétions gonocociques chez la femme et bien les fixer sur le porte-objet. Souvent, le pus de la femme souille le porte-objet de matières graisseuses qui compliquent la coloration, sans quoi le procédé de Thim présente tous les caractères indiqués pour la blennorragie de l'homme.

3. Le procédé de Thim dans la blennorragie chronique de l'homme.

Nous avons vu que le procédé de Thim est bon pour l'examen de la blennorragie aiguë et pour la pratique courante. Mais nous avons constaté le mauvais pouvoir de coloration par le procédé de Thim dans les cas de blennorragie chronique. J'ai fait, dans ce but, de nombreuses expériences et j'ai trouvé de plus en plus que les préparations étaient mal colorées et perdaient leurs qualités élémentaires. En effet, dans les cas chroniques de blennorragie, colorés par Thim, j'ai eu le tableau suivant : coloration très mauvaise, différenciation des éléments difficile, aspect trouble et diffus, quelquefois pire que la coloration au bleu de méthylène seul. La couleur typique de Thim disparaît, le bleu devient bleuâtre, bleu d'azur. Les leucocytes surtout sont mal colorés, souvent en forme de boule ou dissociés, leur protoplasma rose le plus souvent est tout à fait disparu ou, s'il apparaît, il est rose très pâle, leurs noyaux sont bleuâtres clairs, souvent déformés. De même, les leucocytes polynucléaires sont moins nombreux que dans les cas aigus. Les cellules épithéliales sont aussi plus nombreuses que dans les cas aigus, elles sont assez agrandies, avec un noyau très grand, souvent en caryocinèse. Elles perdent souvent leur couleur violette, sont assez transparentes et très claires avec noyau bleuâtre ou faiblement violet. Les autres microorganismes ainsi que les gonocoques, c'est-à-dire ceux que l'on doit colorer au Gram pour les différencier, apparaissent colorés en bleu moins foncé que dans les cas aigus. Tous ces éléments

donnent un fond mauvais et très faible, ce qui ruine le beau tableau obtenu dans les cas de blennorragie aiguë par le procédé de Thim.

Dans tous les cas chroniques, il ne faut pas colorer les préparations plus de 10 secondes, parce que la coloration est de plus en plus mauvaise et foncée, ce qui rend l'examen presque impossible. Quant aux susdits nucléoles, ils ont été invisibles, on n'en a vu aucun, ce qui confirme peut-être l'idée de Thim : qu'on les rencontre dans les cas aigus où l'épithélium est atteint jusque dans ses couches les plus profondes.

Comme conclusion : autant le procédé de Thim est mauvais dans les cas de blennorragie chronique, autant il est bon dans les cas de blennorragie aiguë.

Pour terminer, voici les propriétés caractéristiques qui distingueront la coloration dans la blennorragie chronique de celle dans la blennorragie aiguë :

a) Les leucocytes polynucléaires sont dissociés et moins nombreux que dans les cas aigus. Leurs noyaux sont déformés.

b) Les cellules éphithéliales sont plus nombreuses, dégénérées, plus agrandies et leurs noyaux sont très grands avec caryocinèse.

c) La coloration devient, si elle ne perd pas ses qualités, un peu plus pâle et diminue de clarté.

4. Le procédé de Thim dans la blennorragie chronique chez la femme.

Si le pus est bien prélevé, nous avons les mêmes résultats de coloration que chez l'homme dans la blennorragie chronique. Les cellules épithéliales sont un peu mieux colorées, surtout celles qui proviennent du vagin et du col utérin. Elles ont le protoplasma coloré en rose-violet avec le noyau bleu visible foncé. Les gonocoques, si on en rencontre, doivent toujours être contrôlés au Gram.

IV. LA COLORATION PAR LE PROCÉDÉ DE GALLI-VALERIO ET QUELQUES COLORATIONS DOUBLES

A. Procédé de Galli-Valerio.

J'ai voulu pratiquer, comparativement à la méthode de Thim, le procédé de Galli-Valerio utilisé à l'Institut d'Hygiène et de Parasitologie de Lausanne. Ce procédé emploie deux colorants : le bleu au thymol, le bleu de Löffler ou le bleu de Manson ; l'autre la safranine. Mlle Tchernobilsky[1] a déjà suffisamment parlé de ce procédé.

La safranine et le bleu de méthylène qui constituent le procédé de Galli-Valerio sont d'excellents colorants. Leur coloration rouge-bleu violacée est très intense et bien claire, et très agréable à l'œil.

La safranine a la composition suivante :

Safranine, 0.2
Eau distillée
Alcool ana, 10.0

a) Technique.

On colore le frottis une minute avec le bleu de méthylène, on lave, puis on sèche à la flamme. Ensuite on ajoute la solution de safranine en la laissant agir 15 à 20 secondes ; on lave à l'eau, on sèche à la flamme et l'on examine à l'immersion.

b) Observations personnelles.

Le procédé de Galli-Valerio est un très bon procédé de double coloration. Il est d'une technique assez rapide, et colore d'une façon fort agréable et très intense. Le contraste est très bon. Voici les observations que j'ai pu faire.

[1] Thèse citée.

1. Le procédé de Galli-Valerio dans la blennorragie aiguë chez l'homme

De nombreux leucocytes polynucléaires sont colorés avec le protoplasma rose accentué presque rouge ou violet foncé. Les cellules épithéliales sont colorées en rose-violet clair, et l'on voit un noyau de même couleur, mais plus sombre. Les gonocoques et les microorganismes ressortent très bien en rouge-bleu foncé. Le tableau est fort beau ; le fond étant rose-violacé ; le contraste est parfait.

Les gonocoques ressortent très bien, de telle sorte que le médecin peut rapidement les découvrir. J'ai fait de nombreuses expériences avec ce procédé de Galli-Valerio et toujours j'ai été satisfait de la coloration, qui est d'une technique rapide et pleine de succès dans la recherche du gonocoque. Pour les cas aigus de blennorragie, le procédé de Galli-Valerio est vivement à recommander, et ce procédé, s'il n'est pas supérieur au procédé de Thim, du moins lui est-il égal.

2. Le procédé de Galli-Valerio dans la blennorragie aiguë chez la femme.

Le procédé de Galli-Valerio est excellent pour l'examen du gonocoque chez la femme. Tout se colore comme chez l'homme. Les gonocoques se voient en rouge-violet foncé, et les autres microorganismes de la flore féminine sont également bien différenciés en rouge foncé.

3. Le procédé de Galli-Valerio dans les cas de blennorragie chronique chez l'homme et chez la femme.

a) Chez l'homme. — Ce procédé est aussi très bon pour les cas chroniques, et cette qualité le rend supérieur au procédé de Thim. Toutefois, il faut remarquer que l'intensité de la coloration est un peu affaiblie. Cela est du reste variable. Les cellules épithéliales deviennent plus foncées et le protoplasma leucocytaire plus diffus. Mais les gonocoques, la chose essentielle, ressortent toujours bien en rouge-violet foncé. La coloration, quoique affaiblie, se prête très bien à l'étude de

blennorragie chronique, et surtout lorsqu'on la compare à celle de Thim, elle lui est supérieure.

b) Chez la femme. — C'est comme chez l'homme. La couleur affaiblie est un peu plus rose pâle, mais garde toutefois ses caractères spécifiques.

Enfin, j'ai utilisé le procédé de Galli-Valerio sur la goutte épaisse. Dès l'abord, je dois dire que la safranine est un fort mauvais colorant pour la goutte épaisse et par conséquent, dans ce cas, inférieure au colorant de Thim. Rien n'est bon, tout est désavantageux. La couleur rouge ne peut imprégner tous les éléments. Les éléments sont mal colorés, le contraste est nul. Les gonocoques et autres microorganismes sont masqués et ne se voient que bien difficilement, se différencient avec peine. Si l'on décolore par l'alcool à 96° une goutte épaisse, nous n'obtenons aucun avantage nouveau. Il faut donc éviter la goutte épaisse dans le procédé de Galli-Valerio.

Un jour, en colorant des préparations par le procédé Thim, par erreur, j'ai versé de la safranine sur le porte-objet coloré, pensant que c'était du bleu de méthylène. J'ai été fort surpris alors, malgré mon erreur, de trouver par hasard une couleur combinée de ces deux colorants, très belle et agréable à la vue. La couleur de Thim perdait son caractère rose-violet, de même que la safranine son rouge-bleu, et j'ai obtenu une couleur spéciale d'un violet-rouge intense. Les gonocoques principalement se colorent en rouge foncé, virant vers le violet : le contraste était bien marqué. Il est bien entendu qu'il n'est possible de combiner ces deux colorants que dans les cas de blennorragie aiguë.

L'emploi de la safranine seule, sans le bleu de méthylène, n'est pas possible. En terminant, on doit ajouter que la safranine a une propriété très avantageuse, c'est celle de se conserver très longtemps, plus longtemps que le colorant de Thim.

4. Bleu-Safranine combinés.

M. Galli-Valerio m'a conseillé d'essayer de trouver par la voie de tâtonnements un colorant mixte du pus gonococique et cela en mélangeant bien goutte à goutte du bleu de méthy-

lène et d'autres substances colorantes qui se combinent avec lui (safranine, vésuvine, éosine, vert de méthyle, etc.). J'ai ainsi fait de nombreuses expériences et trouvé enfin que seulement la safranine et la vésuvine mélangées avec du bleu de méthylène donnent de bonnes colorations.

J'ai fait un mélange de trois gouttes de bleu de méthylène au thymol avec 14 ou 15 de safranine; j'ai versé sur le frottis blennorragique en laissant agir 20 secondes, puis lavé et séché à la flamme. A l'examen, après cette technique aussi simple que rapide, j'ai obtenu le tableau suivant : couleur excellente, nette, violet clair, ressemblant au Thim. Le bleu de méthylène prend parfois une coloration rouge. Les leucocytes polynucléaires sont bien colorés : le protoplasma en rose pâle, les noyaux en violet foncé. Les cellules épithéliales sont en rose-violacé clair avec noyau plus foncé. Les gonocoques et autres microorganismes se colorent en violet tirant sur le rouge foncé. Le tableau est clair, le fond en est violet; le contraste en est parfait.

J'ai utilisé cette coloration avec grand succès dans des cas de blennorragie aiguë et chronique chez l'homme et chez la femme. De même, cette safranine combinée est un très bon colorant pour la goutte épaisse, grâce à sa grande force de pénétration à l'intérieur des couches; elle colore bien les gonocoques masqués. Il faut toutefois éviter la décoloration à l'alcool, ce dernier affaiblissant et détériorant la couleur.

La safranine combinée conserve ses qualités durant quinze jours à un mois. Le médecin doit l'observer de temps à autre, et faire un nouveau mélange. J'ai laissé reposer une safranine combinée trois mois. Après ce laps de temps, je l'ai examinée. La petite portion de bleu de méthylène avait disparu. Il restait toutefois quelques traces de bleu de méthylène affaibli dans la safranine. Cette couleur s'est montrée efficace à l'emploi. En effet, les frottis furent colorés, non pas en violet-rouge, mais en rose-violacé intense; les gonocoques en violet foncé et très distincts. Cette coloration combinée, après trois mois, ressemble beaucoup au procédé de Galli-Valerio. Ainsi nous pouvons dire que la safranine combinée est bonne d'un à trois mois après sa préparation.

Voilà comment on peut en préparer la solution : 3 gouttes de méthylène correspondant environ à 0,25 à 0,30 cc.; 14 gouttes de safranine font à peu près 0,60 cc. On fait ainsi une solution selon sa volonté.

B. Bleu-Vésuvine.

La vésuvine ou « brun de Bismarck », associée au bleu de méthylène, possède certaines propriétés avantageuses, entre autres la couleur jaune, très agréable à l'examen, mais malheureusement fatiguant l'œil lors de la recherche des gonocoques. Le contraste est assez bon et lorsqu'il est bien coloré, on a un tableau très clair où les gonocoques se différencient fort bien.

La vésuvine est employée dans une solution aqueuse 2 %.

1. Technique.

On colore les frottis avec du bleu de méthylène pendant une minute, on lave et sèche; puis on verse de la vésuvine qu'on laisse agir durant deux ou trois minutes. Si l'on colore pendant moins de deux minutes, la vésuvine ne se prend pas; au bout de deux minutes, la coloration est vert-brun jaunâtre; au bout de trois minutes elle est mi-jaune, mi-verte; à la quatrième minute, la coloration est complètement jaune; plus longtemps, elle devient jaune diffus. Nous voyons donc que la vésuvine change rapidement de couleur. C'est un colorant avec lequel il faut être très attentif durant la coloration des frottis.

2. Observations.

La vésuvine associée au bleu de méthylène offre de grands avantages dans divers cas, à condition toutefois que la coloration soit bonne. L'emploi de bleu-vésuvine pour la blennorragie aiguë chez l'homme est assez bon. Chez la femme, le bleu-vésuvine n'offre pas grand intérêt; on pourra cependant l'employer et obtenir un résultat moyen. Tout son désavantage provient de son changement de couleur, et alors, suivant la coloration du moment, les gonocoques seront en bleu, en jaune

ou en jaune verdâtre. Elle sera donc avantageuse surtout dans les cas de blennorragie aiguë.

Voici son tableau microscopique :

Le fond est coloré en jaune, on dirait en nuances verdâtres. Les leucocytes polynucléaires ont le protoplasma d'un jaune pâle, presque invisible ; le noyau est d'un bleu-vert avec des nuances jaunâtres ; il est bien entendu que c'est toujours suivant la couleur que prend la vésuvine. Les cellules épithéliales ont le protoplasma jaune ou verdâtre clair, le noyau étant de couleur semblable, mais plus foncé.

Le bleu-vésuvine est un très bon colorant pour la goutte épaisse, mais seulement si l'on décolore par l'alcool à 96° durant plusieurs minutes. On obtient ainsi un résultat favorable : le fond coloré en jaune très clair où les gonocoques ou microcoques sont en bleu foncé.

C'est ainsi que de toutes les couleurs examinées, je trouve que le bleu-vésuvine possède les meilleures propriétés pour la goutte épaisse. Malgré cela, on examinera les bords de la préparation plus que le centre et toujours on décolorera par l'alcool à 96° durant deux à trois minutes.

Le bleu-vésuvine dans la blennorragie chronique des deux sexes n'a pas d'importance.

3. Bleu-Vésuvine combinés.

Lors du procédé de Galli-Valerio, j'ai déjà indiqué les avantages de la « safranine combinée ». J'ai préparé de la même façon la vésuvine et, ainsi tâtonnant, j'ai trouvé que trois gouttes de bleu de méthylène au thymol bien mélangé avec 50 gouttes de vésuvine donne un tableau d'un relief très net en un temps moyen de deux minutes.

La technique est simple et rapide : il suffit simplement de verser sur le frottis le mélange de trois gouttes de bleu de méthylène et de 50 gouttes de vésuvine, de laisser agir *exactement deux minutes*, de laver, sécher et examiner. Il faut se rappeler que trois gouttes de bleu de méthylène font environ 0,25 à 0,30 cc. et que 50 gouttes de vésuvine font environ 1,8 cc. D'après cette indication, il est facile de préparer une

solution. Aussi doit-on savoir que bien qu'elle change de couleur, elle est toujours utilisable. C'est ainsi que j'ai conservé une solution pareille durant trois mois, et malgré cela elle était toujours la même et a donné de bonnes colorations. La couleur avait toutefois viré au bleu-vert accentué.

Le bleu-vésuvine combiné est assez bon dans les cas de blennorragie aiguë, soit chez l'homme, soit chez la femme. Dans les cas de blennorragie chronique, il ne faut pas l'employer. Il est nettement inférieur aux colorants connus. De même pour la goutte épaisse, on le remplacera par le bleu-vésuvine appliqué séparément.

Le bleu-vésuvine combiné est un double-colorant pour les examens gonocociques : il colore différemment les éléments et les gonocoques. Le fond et les éléments deviennent soit verts ou bleus, soit jaunes ou jaunes-verdâtres, plus rarement brunâtres. Les gonocoques et autres microcoques sont bleus foncés, jaunes ou jaunes-verdâtres. Dans la vésuvine combinée fraîche, les gonocoques sont bleus ou jaunes-verdâtres, tandis que dans la solution de trois mois, les gonocoques sont bien visibles en bleu foncé presque noir.

La vésuvine combinée, malgré ses changements de couleurs, est cependant bonne et avantageuse pour le praticien, parce que sa technique est plus rapide et plus simple que celle du bleu de la vésuvine simple. Aussi chacun peut-il, chez lui, la préparer en un laps de temps de une à trois minutes, pour la pratique journalière. Toutefois, la vésuvine combinée est beaucoup inférieure à la safranine combinée ; aussi l'emploi de la vésuvine combinée ne sera-t-il prévu que dans les cas où l'on manquera de meilleurs colorants doubles.

C. Bleu-vert de méthyle.

On utilise le bleu au thymol et une solution aqueuse 1-2 % de vert de méthyle.

1. *La technique* est celle-ci : Tout d'abord on verse le bleu de méthylène en laissant agir une minute ; puis lavage et

séchage à la flamme ; puis on ajoute le second colorant, le vert de méthylène ; on laisse agir deux à trois minutes, puis on lave, on sèche à la flamme et on examine à l'immersion.

2. *Observations.* — C'est une coloration qui peut être placée sur le même rang que le bleu-vésuvine que je viens d'examiner. Le contraste est fort bon. Toutefois il faut le manipuler avec attention durant la coloration qui risque de devenir facilement diffuse. Quoique se combinant avec le bleu de méthylène, le rôle des deux colorants est bien distinct.

Son emploi est très bon dans les cas de blennorragie, soit aiguë, soit chronique, chez l'homme comme chez la femme ; cependant, dans les cas chroniques, l'intensité de couleur est quelque peu affaiblie ; il rend tout de même d'utiles services pour ces cas.

Au microscope, on a le tableau suivant : le fond est verdâtre, l'aspect vert avec de légères nuances bleues. Le contraste des éléments est très satisfaisant : les leucocytes polynucléaires sont très bien visibles avec leur protoplasma coloré en vert ou verdâtre et leur noyau vert-bleu foncé ; les cellules épithéliales sont colorées en vert clair ou bleuâtre avec un noyau de même couleur, mais plus sombre. Les gonocoques et autres microorganismes se distinguent facilement en bleu foncé, presque noir, sur le fond vert. Il faut noter qu'avec le bleu-vert de méthyle les couches sont très transparentes et qu'ainsi les gonocoques se détachent bien. La couleur et le contraste sont très agréables. La lumière se prend surtout aux places les moins épaisses et où la superposition des éléments est la moindre. Par sa technique simple et rapide, le vert de méthyle associé au bleu de méthylène est vivement à recommander.

Pour la goutte épaisse, l'emploi de notre colorant est assez limité. Nous savons pourtant que les frottis colorés en fond vert ou jaune sont favorables pour la goutte épaisse ; ainsi le vert de méthyle donne un fond vert, assez bon pour les gouttes épaisses ; mais malheureusement, en décolorant par l'alcool, la couleur verte se détériore, le vert disparaît et il ne reste que le bleu. Malgré cela, les gonocoques sont bien visibles en bleu, et la préparation est assez claire.

D. Bleu-Eosine.

L'éosine, associée au bleu de méthylène, donne un aspect trouble et diffus ; elle colore mal les éléments dans le cas de blennorragie et n'offre aucun avantage pour les gonocoques.

L'éosine s'emploie en solution aqueuse de 1 %.

La technique est la suivante : on colore le frottis pendant une minute avec du bleu de méthylène, on lave et on sèche à la flamme ; ensuite on verse l'éosine, en la laissant agir de trois à cinq secondes, mais pas davantage, autrement tout serait fort diffus.

Le bleu-éosine n'est pas avantageux ni dans les cas de blennorragie aiguë, ni dans celui de blennorragie chronique, que ce soit chez l'homme ou chez la femme. Même désavantage pour la goutte épaisse.

Un fait, toutefois, est à remarquer : si l'on verse de l'éosine sur le frottis coloré par le Thim, on obtient une couleur violette beaucoup plus claire et moins diffuse que dans les autres cas ; les leucocytes sont beaucoup plus transparents et ont un aspect et un contraste assez satisfaisant. C'est le seul emploi avantageux de l'éosine ; mais dans la pratique on n'y aura jamais recours lorsqu'on aura de meilleurs colorants à sa disposition.

V. QUELQUES COLORATIONS SIMPLES ET MÉTHODE DE GRAM

Nous allons étudier brièvement d'autres colorants en les comparant aux procédés précédents. Tous ces colorants sont plus ou moins importants et ont leur utilité dans la pratique courante. Quoique d'ordre secondaire, ces divers colorants peuvent être employés, si de meilleurs font défaut, car plusieurs ont des propriétés et des qualités satisfaisantes. Ces colorants sont les suivants : le bleu de méthylène, la fuchsine, le violet

d'Erlich et le crayon violet de Friedberger. Enfin nous étudierons la méthode de Gram, estimant qu'elle est de première importance pour les médecins praticiens dans le diagnostic du gonocoque.

A. Bleu de méthylène.

Sous ses formes différentes, c'est un colorant souvent employé pour la coloration du gonocoque. J'ai employé le bleu de méthylène au thymol ou bleu de Piana.

1. *La technique* est simple : on verse le bleu de méthylène sur les frottis, en le laissant agir une minute au plus; puis on lave et on sèche le frottis à la flamme. Enfin on l'examine à l'immersion.

2. *Observations.* — Le bleu de méthylène est employé comme simple colorant dans la recherche du gonocoque. Il donne de bons résultats pour les cas de blennorragie aiguë ou chronique soit chez l'homme, soit chez la femme. Il n'y a pas de contraste : tous les éléments et les gonocoques sont colorés en bleu assez intense. Dans la grande guerre, ce fut presque l'unique colorant employé pour la recherche du gonocoque. Aussi pouvons-nous l'appeler « le colorant de nécessité », vu son emploi mondial, dû à sa technique rapide et à son prix bas. Le bleu de méthylène ne fait pas bien ressortir les gonocoques des éléments : il ne donne pas de contraste. Il n'est surtout pas à employer par le médecin débutant à cause de sa tendance à donner des colorations diffuses. Il va de soi que dans la mesure du possible on aura toujours recours à un colorant meilleur et double, n'utilisant le bleu de méthylène que comme colorant de « *nécessité* ».

Pour les gouttes épaisses, le bleu de méthylène est désavantageux, soit qu'on l'emploie avec ou sans décoloration par l'alcool à 96°.

B. La Fuchsine phéniquée de Ziehl.

La fuchsine phéniquée est un très fort colorant, mais en cas de nécessité peut être utilisée pour les gonocoques. On ne

doit pas l'employer diluée à l'eau, parce que la coloration devient plus faible et l'on ne peut plus distinguer facilement les éléments. La meilleure chose à faire est de verser la fuchsine sur la préparation, compter rapidement de un à trois (ce qui correspond à une ou deux secondes tout au plus) et laver immédiatement sous le robinet d'eau. De cette façon, on obtient un bon colorant simple, qui colore tout en rouge; les protoplasmas seulement sont en rouge diffus; les noyaux sont en rouge très foncé. Les gonocoques et autres microorganismes se détachent bien en relief sur le fond rouge. Le seul inconvénient est que les gonocoques ne montrent pas leur aspect caractéristique; aussi évitera-t-on d'employer cette coloration, si l'on a de meilleurs colorants à disposition.

C. Crayon violet de Friedberger.

En Allemagne, Friedberger a eu l'idée de faire des crayons avec certaines couleurs, telles que : le violet de gentiane, éosine, safranine, etc. Ces crayons sont très utiles pour les praticiens; chaque médecin peut en effet les porter sur lui et colorer les frottis selon désir.

1. *La technique* est fort simple : il suffit de mettre sur un frottis fixé une bonne goutte d'eau (deux au plus) et d'y faire plonger un certain temps le crayon de Friedberger avec la couleur désirée et de colorer ainsi les frottis avec des temps différents pour les divers crayons; ensuite lavage, séchage à la flamme et examen. Il est de toute importance de faire des essais jusqu'à ce qu'on ait trouvé un temps de coloration convenable.

J'ai usé de cette méthode avec le crayon violet de Friedberger (violet de gentiane). Il est recommandable de mettre une bonne goutte d'eau (deux au plus) sur le porte-objet, de laisser tremper le crayon d'une minute dix secondes jusqu'à une minute trente secondes au plus, puis laver, sécher et examiner. Il faut éviter de mettre trop d'eau, car les éléments se surcolorent. Il faut également s'en tenir strictement au temps indiqué. En effet, cette couleur violette étant très forte, j'ai eu

souvent moi-même des ennuis, ou quelques résultats fort médiocres.

2. *Observations.* — Le crayon de Friedberger est très bon pour les cas de blennorragie aiguë soit chez l'homme, soit chez la femme. Dans les cas de blennorragie chronique, ce crayon n'est pas avantageux. Le fond est violet, les éléments bien visibles. Le protoplasma polynucléaire est violet faible, et le noyau violet foncé, bien visible. Les cellules épithéliales sont de la même couleur, mais le plus fréquemment surcolorées en violet foncé. Les gonocoques se détachent bien et on les voit en violet foncé, avec des nuances rouges, par une lumière plus intense. Ils sont bien visibles même si les leucocytes sont surcolorés. L'avantage du crayon, c'est qu'avec lui le médecin fait la coloration très rapidement et très simplement.

Le désavantage du crayon violet est que les éléments deviennent facilement surcolorés; dans ce dernier cas, les leucocytes s'arrondissent, semblables à des boules diffuses; la préparation n'est pas partout bien colorée : certains endroits le sont bien, mais d'autres ne le sont que fort mal.

Notons enfin que le crayon violet de Friedberger peut être employé pour la méthode de Gram, où il remplace le violet d'Erlich, comme première couleur dans cette méthode. En utilisant ce crayon dans la méthode de Gram, j'ai obtenu de très bons résultats. Dans ce cas, il faut mettre quelques gouttes d'eau (3 à 4) sur le frottis, laisser tremper le crayon deux minutes, puis faire agir cette couleur dissoute durant deux à trois minutes, ensuite laver, fixer au Lugol..., etc., comme l'on fait dans le procédé de Gram.

Surtout se garder de laisser le crayon toucher les frottis sur le porte-objet (surcoloration); avoir soin de le tenir au-dessus, dans l'eau.

D. Le violet d'Erlich.

Quelques mots sur le violet d'Erlich. Ce violet, qui contient de la gentiane, est employé dans les cas de blennorragie aiguë des deux sexes. Dans les cas chroniques, il n'est pas avantageux. C'est un colorant de nécessité extrême.

La technique est la même que pour le crayon violet de Friedberger : on met quelques gouttes d'eau sur le frottis, on verse le violet d'Erlich en laissant agir une minute; ensuite on lave, on sèche à la flamme et on examine. Nous avons un fond violet; le protoplasma des leucocytes est violet intense et dense; le noyau est violet foncé. La cellule épithéliale est violet-rose avec noyau plus foncé. Les gonocoques et d'autres microcoques se colorent en violet foncé presque noir. Ils se détachent bien; mais dans la majorité des cas la forme gonococique n'est bien distincte que par places.

E. Méthode de Gram.

Pour terminer avec les colorants, je veux m'arrêter quelque peu à la méthode de Gram, puisque c'est la méthode la plus sûre de contrôle et de vérification du gonocoque, car le Gram ne colore pas du tout les gonocoques.

Dans la méthode de Gram on utilise : le violet d'Erlich, le Lugol, l'alcool absolu à 96° et un colorant pour la recoloration.

Voici la formule du violet d'Erlich :

Solution alcoolique saturée de violet de gentiane	10,0
Eau d'aniline à 5 %	90,0

On colore donc le frottis avec ce violet en laissant agir cinq minutes; ensuite on lave à l'eau et on ajoute la solution de Lugol ou iodo-iodurée, composée de :

Iodure de potassium	2,0
Iode	1,0
Eau distillée . . .	5,0

Sitôt que la solution est prête, on ajoute de l'eau distillée jusqu'à 300 grammes.

Le frottis, lavé à l'eau après la coloration au violet d'Erlich, est immédiatement (sans séchage) fixé avec la solution de Lugol qu'on laisse agir deux à trois minutes. Après la fixation au Lugol, on décolore à l'alcool à 96°. Ensuite nouveau lavage à

l'eau et sans sécher on peut le recolorer avec un bon colorant.

Pour la recoloration, on peut employer : la safranine, la vésuvine et la fuchsine de Ziehl. Mlle Tchernobilsky[1] recommande également le neutralrot.

La safranine pour la recoloration peut s'employer avec très grand succès. Il faut toutefois la diluer : une goutte de safranine avec neuf gouttes d'eau. On verse la safranine diluée sur le frottis décoloré par l'alcool et lavé à l'eau, en la laissant agir 30 secondes; ensuite on lave, on sèche à la flamme et on examine.

La vésuvine est également bien employée dans le procédé de Gram. Sur le frottis décoloré à l'alcool et lavé à l'eau, on verse la vésuvine qu'on laisse agir 30 à 40 secondes; puis on lave, on sèche à la flamme et on examine.

La fuchsine de Ziehl est un puissant et excellent colorant; elle est supérieure, pour le Gram, à la vésuvine, mais inférieure à la safranine. La marche à suivre est la même qu'avec la safranine et la vésuvine. Il importe d'être prudent et très attentif durant le temps de coloration. Vu sa grande intensité, on ne versera la fuchsine de Ziehl sur le frottis décoloré à l'alcool qu'après avoir mis précédemment quelques gouttes d'eau. Quelques secondes de coloration avec la fuchsine suffisent pour avoir une surcoloration. Je conseille cette façon de procéder : on place le frottis avec quelques gouttes d'eau près d'un robinet d'eau courante; on verse la fuchsine en comptant rapidement jusqu'à cinq (ce qui correspond environ à une ou deux secondes), on lave immédiatement, etc. On peut aussi compter jusqu'à 10 ou 12 (ce qui correspond environ à quatre à cinq secondes), puis laver.

En deux secondes, les éléments sont colorés faiblement, mais les gonocoques sont bien distincts en rose pâle; en quatre à cinq secondes, les éléments sont bien colorés en rose clair; passé ce temps, on obtient les éléments et les gonocoques en rouge foncé, ce qui ne convient pas pour la méthode de Gram à cause de sa facile superposition au violet et la dif-

[1] **Thèse citée, page 14.**

ficulté de reconnaître si les germes sont Gram positifs ou négatifs.

La safranine diluée recolore les gonocoques en rouge pâle; ils sont très distincts et fort visibles. La vésuvine colore les gonocoques en vert-jaune très pâle; ils sont à peine visibles. Aussi la safranine est-elle le meilleur grand colorant pour la méthode de Gram; viennent ensuite la fuchsine de Ziehl, la vésuvine et le neutralrot. Disons une fois de plus *que le Gram est toujours négatif sur les gonocoques,* si la technique est bien faite.

Pour l'examen par la méthode de Gram, on doit couper en deux le frottis du pus d'un malade ou bien l'étendre aux deux extrémités du porte-objet et procéder comme suit : on en utilisera une pour la simple coloration avec n'importe quel colorant gonococique, l'autre pour la méthode de Gram. Quand le frottis, après fixation au Lugol, est décoloré par l'alcool à 96°, on maintiendra de l'alcool jusqu'à ce que le violet-noir devienne pâle.

Comme nous le voyons, la méthode de Gram est compliquée, aussi est-il de toute importance de travailler avec une grande attention, autrement l'on s'expose à des erreurs. En outre, il faut employer exclusivement la méthode de Gram et non pas toutes ses modifications.

VI. LA TECHNIQUE DE L'ÉCLAIRAGE POUR L'EXAMEN DES PRÉPARATIONS COLORÉES

Dans tous les procédés que nous avons étudiés jusqu'à présent pour la recherche du gonocoque, il est de toute importance d'éclairer les gonocoques et les éléments au microscope, soit en se servant de la lumière du jour, soit de la lumière électrique. La lumière du jour, lorsqu'elle est bonne et suffisante, est tout ce qu'il y a de mieux pour l'éclairage des gono-

coques; la lumière solaire intense donne fréquemment des changements dans la couleur des nuances; cela fatigue l'œil et rend difficile l'examen microscopique.

Dans les jours sombres, nuageux, ou au crépuscule, lorsque la lumière du jour n'est pas suffisante, l'emploi d'une lampe électrique bien couverte est à recommander; sa lumière devra tomber sur le miroir et l'ouverture du diaphragme. Cette lampe électrique doit se placer en avant, à une petite distance du microscope; au moyen du miroir plan, on règle à volonté la quantité de lumière, en évitant toutefois une forte intensité. On préférera une lumière douce et agréable pour l'examen. Cette méthode offre un grand avantage au médecin qui pourra faire l'examen microscopique de jour comme de nuit. La lumière artificielle est très bonne pour la recherche du gonocoque.

Si nous examinons des préparations colorées par le Thim à la lumière du jour, nous voyons un fond rose-violet et des gonocoques bleus foncés, presque noirs. Avec la lumière électrique, les couleurs deviennent plus claires et nettes; les gonocoques se voient en noir et non plus en bleu. Nous avons en outre l'avantage de pouvoir mieux distinguer la forme en grain de café du gonocoque.

Maintenant, nous allons encore rapidement examiner pour quelles couleurs la lumière électrique est avantageuse. Toutes les couleurs s'y prêtent sauf : le rouge intense (fuchsine), le violet intense (safranine combinée ; crayon violet de Friedberger et violet d'Erlich); le jaune (bleu-vésuvine sauf si elle est verdâtre). Pour ces colorants, la lumière électrique peut être suffisante, mais il est préférable de se servir de la lumière du jour. Pour toutes les autres couleurs, la lumière électrique est très bonne. Le colorant de Thim se prête merveilleusement à cette dernière : tout est plus accentué et les nucléoles apparaissent bien mieux qu'avec la lumière du jour. Avec le bleu associé à la safranine également, les éléments sont plus intenses et les gonocoques plus vifs. L'éclairage électrique est aussi avantageux avec le bleu de méthylène, le bleu-vert de méthyle et la bleu-éosine; les éléments et les gonocoques se dessinent fortement et agréablement. Dans la méthode de Gram, l'éclai-

rage électrique joue aussi un grand rôle; les gonocoques sont bien visibles avec la safranine et la fuchsine; avec la vésuvine c'est moins bon, car ils sont plutôt jaunes.

Avec une couleur convenable, l'examen des gouttes épaisses par l'éclairage électrique est très avantageux.

De tout cela, il ressort que l'éclairage électrique peut être très souvent d'une grande utilité pratique dans l'examen gonococique et d'un grand secours pour le praticien.

VII. LA RECHERCHE DU GONOCOQUE PAR LA MÉTHODE DE LA PROVOCATION

Jusqu'ici, nous avons étudié les méthodes de recherche des gonocoques dans un écoulement blennorragique, existant chez le malade au moment de la consultation médicale. Mais fort souvent le praticien aura besoin de provoquer l'écoulement blennorragique pour y chercher la présence du gonocoque.

La méthode de provocation a été appliquée ces dernières années. On peut la distinguer en : provocation locale et provocation à distance par injections intramusculaires.

La provocation locale n'est pas d'une grande importance actuellement en médecine, parce qu'elle se fait sur un territoire fort circonscrit avec effets incertains. Comme agents de provocation, nous avons : le sublimé, le nitrate d'argent, le lait stérilisé, etc., injectés dans l'urèthre.

Les injections provocatrices sont au contraire beaucoup plus importantes et surtout intéressantes pour le médecin, le malade et la société elle-même. Les deux principales sont : l'*Arthigon ordinaire et extra-fort* (extra-stark) et l'*Aolan*. Tous deux ont attiré mon attention et je les ai étudiés avec un vif intérêt, autant qu'il m'a été possible de le faire. Malheureusement, mon étude n'a porté que sur un nombre restreint de malades, donc de cas limités ; par conséquent, j'ai eu recours

à certains médecins qui ont fait pour mon propre compte les expériences nécessaires. Cela m'amène à remercier vivement MM. les Docteurs Isenegger et Guisan.

L'Arthigon et l'Aolan jouissent de deux propriétés : curative et diagnostique. Le premier, l'Arthigon, peut parfois être employé avec un résultat convenable dans certaines complications blennorragiques (épididymites, prostatites, arthrites, etc.) ; il est bon surtout chez l'homme comme curatif et diagnostic, c'est-à-dire pour la provocation gonococique. Chez la femme, c'est l'Aolan qui est très efficace pour la provocation, tandis que sa propriété curative a de l'utilité dans les complications blennorragiques des deux sexes.

1. L'Arthigon

L'Arthigon est une préparation de cultures mortes de gonocoques. Il provoque une réaction chez l'homme atteint d'une blennorragie chronique sans écoulement, qui fait que 24 heures après une injection de $^1/_2$ à 1 cc. d'Arthigon, on a un écoulement blennorragique plus ou moins caractéristique et abondant et dans lequel on décèle microscopiquement les gonocoques.

L'Arthigon ordinaire comme l'extra-fort ont tous deux une influence plus ou moins bonne pour la provocation dans l'organisme, afin de pouvoir chasser les gonocoques retranchés à l'intérieur des organes génitaux. L'Arthigon extra-fort est toutefois bien préférable. Ces dernières années, comme presque tous les produits, l'Arthigon n'a plus ses bonnes qualités d'avant-guerre. Aussi les médecins obtiennent-ils des résultats variables dans la méthode de provocation par l'Arthigon ; aussi préfère-t-on employer l'extra-fort. Les doses pour l'emploi en sont variables. En général, chez les adultes, on recommande 0,5 cc. d'injection intra-fessière d'Arthigon (enfants : la moitié). Dans mes expériences, il a été fait 1,0 cc. et même 1,20 cc. sans aucune réaction de l'organisme. Quelquefois on remarque de la courbature et de la douleur, mais sans réaction organique plus grave. L'écoulement apparaît 24 heures au plus tard après l'injection.

Je dois mentionner que l'Arthigon donne de meilleurs résultats, au point de vue provocation, dans une blennorragie sans complication. Dans les cas d'épididymite surtout il est presque toujours sans effet, et c'est bien rare qu'on découvre les gonocoques dans l'écoulement, parce qu'ils sont enfermés dans le foyer inflammatoire ou détruits.

On doit enfin pour cette injection provocatrice distinguer trois séries de cas : une première, celle où les malades, atteints d'une blennorragie aiguë, ne sont pas suffisamment traités par un médecin ; une deuxième, celle où les malades ne sont pas du tout soignés ou seulement par eux-mêmes ou un non médecin ; une troisième, celle où les malades sont convenablement soignés et cela par un spécialiste.

L'Arthigon est avantageux chez les malades de la première et de la deuxième série ; il donnera presque toujours un écoulement fort avec gonocoques. J'ai assisté à plusieurs expériences dans un hôpital de Belgrade. Pour la troisième catégorie, l'Arthigon n'a souvent aucune influence et dans ce cas il servira au médecin de directive pour un traitement encore plus efficace et continu. Pour toutes ces raisons, le médecin doit se garder de laisser de côté l'Arthigon de peur de prolonger la maladie.

Voici cinq cas de blennorragie chronique avec provocation à l'Arthigon :

1^er^ cas : Un homme de 26 ans, atteint d'une blennorragie depuis 1918 avec dernière rechute en juillet 1922. Il n'a jamais poussé son traitement jusqu'au bout. En août 1922 : épididymite droite. En janvier 1923 : une goutte au méat chaque matin. Il s'est traité lui-même par injections et pilules. *Diagnostic* après l'examen le 13 février 1923 : uréthrite chronique par infection secondaire. *On lui injecte 2 cc. d'Arthigon ordinaire.* Le malade n'a aucune réaction générale (douleur, température, etc.). La sécrétion augmente chaque matin et devient un peu plus jaunâtre. Le microscope décèle, par la coloration ordinaire et le contrôle au Gram, la présence des gonocoques.

2^me^ cas : Un homme de 23 ans avec une épididymite aiguë, depuis le 12 octobre 1922 ; *le 4 novembre 1922 on lui*

injecte 0,5 cc. d'Arthigon extra-fort ; aucune réaction ; pas d'écoulement.

3me cas : Un homme de 30 ans; il a un écoulement le 16 octobre 1922 avec épididymite. *Le 23 janvier 1923, on lui injecte 0,8 cc. d'Arthigon extra-fort.* Aucune réaction, aucun écoulement.

4me cas : Un homme de 30 ans, atteint d'une blennorragie depuis juillet 1922. Il se croit guéri et boit de l'alcool. Le 1er novembre 1922, nouvel écoulement qui tarit bientôt; le matin, il remarque une goutte claire. A l'examen, on ne trouve pas de gonocoques. *Le 24 janvier 1923, on lui fait une injection intra-fessière de 1 cc. d'Arthigon extra-fort.* Le malade n'a pas de réaction. Un petit écoulement se produit où l'on constate la présence de gonocoques.

5me cas : Homme niant d'être atteint de blennorragie. Il se plaint d'un léger écoulement depuis des mois et de douleurs au testicule droit. A l'examen, pas de gonocoques dans l'écoulement. *On lui injecte 1,20 cc. d'Arthigon extra-fort.* Pas de réaction. Dans l'écoulement, aucun gonocoque.

Par ce petit nombre de cas, nous voyons donc que l'Arthigon peut être employé pour l'injection provocatrice, car, dosé, il n'est pas dangereux; que dans les cas d'épididymite il est presque sans effet; que dans un écoulement non blennorragique il est très utile pour le diagnostic, et qu'enfin, dans la blennorragie mal traitée, il donne un écoulement et chasse les gonocoques en les mettant à découvert.

2. Aolan.

L'Aolan est très efficace surtout chez les femmes. C'est un produit allemand dont le lait stérilisé est à la base. Il est curatif et diagnostique. Comme diagnostique, il s'emploie pour provoquer dans l'organisme un écoulement blennorragique, sur les organes génitaux de la femme qui n'en présente plus après la dernière blennorragie.

La dose est de 10 cc. chez les adultes et de 3 à 4 cc. chez les fillettes. On fait des injections intra-fessières. La dose

d'Aolan maximale (qui n'a du reste pas été fixée jusqu'à présent) pourra s'élever jusqu'à 30 cc. (injection intra-fessière) et cela sans difficulté et sans réaction (cette dernière est bien rare). Le repos au lit n'est pas nécessaire; l'effort et l'alcool seront défendus. La manifestation anaphylactique n'a jamais été observée. L'écoulement apparaît 24 heures après l'injection.

Après l'injection, il est de règle de prendre 24 heures plus tard toutes les sérosités de la vulve, du vagin et du col utérin. On étale le liquide obtenu aux deux bouts d'un porte-objet. On colore l'un par le procédé de Thim ou par le procédé de Galli-Valerio et l'autre par le procédé de Gram.

Au sujet de l'Aolan, je suis heureux de pouvoir citer quatre cas d'injections provocatrices qui furent tous positifs, satisfaisants et très intéressants. Dans deux cas, il s'agit de deux fillettes ayant acquis une blennorragie sans complications. *Chez les quatre, aucun écoulement blennorragique et pas de gonocoques.*

1er cas : L. P., âgée de 4 ans, est en traitement à l'hôpital depuis le 9 janvier 1923 pour vulgo-vaginite blennorragique et condylomes acuminés. Après un traitement d'un mois, le 7 février 1923, on constate que les pertes ont diminué, que les gonocoques (vérifiés par le Gram) sont négatifs. Les leucocytes polynucléaires sont assez nombreux; il y a beaucoup de microbes banaux. *Le 8 février 1923, à 9 heures du matin, on lui injecte 4 cc. d'Aolan* (injection intra-fessière). Les 9 et 10 février 1923, la réaction fébrile est nulle; aucune douleur locale ou générale. L'écoulement n'a pas augmenté. A l'examen microscopique et avec la vérification au Gram, on constate la présence d'assez nombreux gonocoques dans les sécrétions.

2me cas : J. S., 6 ans, est en traitement à l'hôpital pour vulvo-vaginite blennorragique depuis le 21 janvier 1923.

Depuis le début de janvier, l'écoulement a presque cessé; la recherche du gonocoque, à trois reprises a donné un résultat négatif. Le *8 février 1923, à 9 heures du matin, on lui a fait une injection de 4 cc. d'Aolan* (dans la fesse gauche). Les 9 et 10 février 1923, l'on n'a aucune réaction fébrile, pas de douleur; état général satisfaisant. L'écoulement n'a pas augmenté

(il est du reste difficile d'apprécier celui-ci chez les enfants). L'examen microscopique montre de très abondants polynucléaires et beaucoup de cellules épithéliales. On remarque quelques nids intra-cellulaires de gonocoques; le tableau rappelle une infection aiguë. Des microbes associés s'y trouvaient en grand nombre.

3me cas : H. M., fille de 15 ans, est en traitement à l'hôpital depuis le 16 novembre 1922 pour blennorragie aiguë avec des gonocoques dans le vagin et la portion utérine. Le 1er février 1923, pas d'écoulement, pas de gonocoques. *Le 8 février 1923, on lui injecte 9 cc. d'Aolan* (injection intra-musculaire). Les 9 et 10 février 1923, pas de réaction fébrile, aucune réaction douloureuse locale ou générale. L'écoulement vaginal augmente; les pertes sont plus épaisses, plus jaunâtres. Un examen de l'orifice externe montre des paquets de mucus qui s'écoulent. Dans le vagin et dans le canal cervical, on trouve des gonocoques.

4me cas : Mlle C., fille de 24 ans, est entrée à l'hôpital le 28 novembre 1922, atteinte d'une blennorragie aiguë avec des gonocoques. Le 29 janvier 1923, après un traitement efficace, les pertes ont cessé; on ne trouve pas de gonocoques, ni dans l'urèthre, ni dans le vagin, ni dans le col utérin. Le *31 janvier 1923, on lui injecte 10 cc. d'Aolan* (dans la fesse gauche): douleurs locales et courbatures légères dans les 24 heures qui suivent l'injection; 18 heures après l'injection, la malade constate l'apparition de pertes blanches, claires et assez abondantes. L'examen microscopique décèle la présence de gonocoques intra-cellulaires dans le vagin et dans le cervix.

Après la réussite de ces quatre cas, je peux constater que l'Aolan est un très bon réactif de provocation chez la femme et par son emploi le praticien pourra presque toujours découvrir la blennorragie et contrôler son traitement. La réaction est nulle ou minime. Après l'injection intra-musculaire d'Aolan, les cas considérés comme guéris donnent des gonocoques cachés. Par toutes ces raisons, il est évident que l'Aolan a fait ses preuves, et il est vivement à recommander.

C'est par l'Aolan surtout que les examens des prostituées

pourront être facilités, parce que, avec l'Aolan, les médecins pourront mieux découvrir les gonocoques, que les prostituées d'aujourd'hui savent bien éloigner par des lavages au moment de la consultation. Aussi l'Aolan jouera-t-il un rôle très important dans les examens judiciaires ou médico-légaux.

VIII. COMPARAISONS DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LES COLORANTS EMPLOYÉS

J'exposerai en résumé tous les caractères des colorations étudiées dans cette thèse au point de vue de la technique, de la coloration du gonocoque, des cas où elles sont indiquées. De cette façon, un coup d'œil rapide permettra la comparaison des caractères essentiels des colorations employées :

1. *Coloration de Thim :* Technique extrêmement rapide; gonocoques bleus foncés, presque noirs. Indiqué pour la blennorragie aiguë des deux sexes; aussi pour la goutte épaisse, mais sans décoloration à l'alcool à 96°.

2. *Coloration de Galli-Valerio :* Technique un peu moins rapide que le Thim; gonocoques en rouge-bleu foncé. Indiquée pour la blennorragie aiguë et chronique des deux sexes.

3. *Bleu-Vésuvine :* Technique assez rapide; gonocoques jaunes-verdâtres ou bleus. Indiquée pour la blennorragie aigüe chez l'homme. Très bon pour la goutte épaisse à condition de décolorer à l'alcool à 96°.

4. *Bleu-Safranine combinés :* Technique extrêmement rapide; gonocoques en violet tirant sur le rouge foncé. Indiquée pour la blennorragie soit aiguë, soit chronique, dans les deux sexes. Très bonne pour la goutte épaisse, mais sans décolorer à l'alcool à 96°.

5. *Bleu-Vésuvine combinés :* Technique extrêmement rapide; gonocoques en bleu foncé ou jaune verdâtre. Indiquée dans la blennorragie aiguë des deux sexes. Elle est inférieure au bleu-safranine combinés.

6. *Bleu-vert de méthyle* : Technique assez rapide; gonoco-

ques en bleu foncé presque noir. Indiquée pour la blennorragie soit aiguë, soit chronique dans les deux sexes. Peu utile pour la goutte épaisse (sans décolorer à l'alcool à 96°).

7. *Bleu-Eosine* : Technique assez rapide, mais coloration diffuse; pas indiquée pour l'examen du pus blennorragique. Inférieure aux autres colorants gonocociques.

8. *Bleu de Méthylène* : Technique simple et assez rapide; gonocoques en bleu intense. Indiquée dans la blennorragie soit aiguë, soit chronique dans les deux sexes.

9. *Fuchsine diluée de Ziehl* : Technique très rapide; gonocoques en rouge foncé. Indiquée en cas de nécessité extrême pour la blennorragie aiguë des deux sexes.

10. *Violet d'Erlich* : Technique assez rapide; gonocoques en violet foncé presque noir. Indiquée en cas de nécessité extrême pour la blennorragie aiguë des deux sexes.

11. *Crayon violet de Friedberger* : Technique assez simple et assez rapide. Il a les mêmes propriétés et les mêmes indications que le violet d'Erlich cité.

12. *Gram* : Méthode indispensable pour le diagnostic du gonocoque. La pratiquer avec le violet d'Erlich. Après la décoloration à l'alcool à 96°, on emploie pour la recoloration une de ces trois colorations : safranine diluée (excellente, gonocoques en rouge-rose pâle) ou fuchsine diluée (bonne, mais inférieure à la safranine — gonocoques en rose pâle) ou vésuvine (inférieure aux deux précédentes — gonocoques en jaune verdâtre pâle). Indiquée pour le contrôle d'une blennorragie soit aiguë, soit chronique, dans les deux sexes. C'est la coloration la plus sûre que nous possédons aujourd'hui pour la vérification du gonocoque.

IX. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1. Nous manquons encore à l'heure actuelle d'un colorant spécifique du gonocoque.

2. Tous les procédés existants sont plus ou moins bons dans les cas de blennorragie aiguë, soit chez l'homme, soit

chez la femme. Par contre, fort peu de colorants sont bons en cas de blennorragie chronique, et particulièrement chez la femme.

3. Le procédé de Thim est un procédé de tout premier ordre pour la coloration du gonocoque.

4. Le procédé de Galli-Valerio est à peu près l'équivalent de celui de Thim.

5. La bleu-vésuvine et le bleu-vert de méthyle sont des colorants très variables en intensité. Leur valeur est de beaucoup inférieure au procédé de Galli-Valerio.

6. Le bleu de méthylène, très couramment employé, est un colorant seulement de nécessité pratique. Il est préférable de l'employer avec un second colorant (safranine, vert de méthyle vésuvine et éosine).

7. D'autres colorants tels que la fuchsine de Ziehl (diluée), le crayon violet de Friedberger, le violet d'Erlich, etc., ne s'emploieront pour l'examen gonococique qu'au cas où de meilleurs colorants manqueraient.

8. Les procédés combinés de bleu-safranine ou de bleu-vésuvine (mais surtout bleu-safranine) sont des procédés très avantageux pour les praticiens; la technique est simple, la double coloration bonne, et l'examen, dans différents cas, fort simplifié. Le seul désavantage est que les solutions ne se conservent pas longtemps.

9. La méthode de Gram, suivie d'une recoloration (surtout à la safranine), doit toujours être employée à côté des colorations ordinaires pour le diagnostic du gonocoque.

10. La lumière électrique est fort avantageuse pour la mise en évidence du gonocoque dans les préparations microscopiques.

11. Les injections provocatrices (surtout à l'Aolan) ont une très grande valeur dans le diagnostic de la blennorragie sans écoulement.